保幼激素类似物对德国小蠊卵黄发生及繁殖的影响

于长明 刘 泉 李成文
（军事医学科学院微生物流行病研究所，北京 100071）

摘要 应用 ELISA、单向免疫扩散法，研究了保幼激素类似物（灭幼宝）对德国小蠊 *Blattella germanica* 卵黄发生的影响；同时，观察了灭幼宝对德国小蠊繁殖的影响。灭幼宝促进了德国小蠊脂肪体 Vg 的合成，使血淋巴 Vg 的浓度明显增高，出现时间早于对照组；且变化规律不同于对照组，呈双峰模式。灭幼宝处理组昆虫卵巢中 Vt 的含量在第 5 天、第 7 天明显高于对照组，而在第 9 天明显下降，仅为对照组的 50% 左右，而此时对照组卵巢的 Vt 含量则上升到处理组第 7 天水平。灭幼宝处理新羽化的雌虫，导致不育。

关键词 灭幼宝，卵黄原蛋白，卵黄蛋白，德国小蠊，繁殖

德国小蠊 *Blattella germanica* 繁殖能力强，难于防治。灭幼宝，具有强烈的保幼激素活性，能导致成虫不育，对蟑螂幼虫有非常高的生物活性，是一种新型的蟑螂防治药物[1,2]。

昆虫的卵黄发生是卵巢成熟的关键，直接影响昆虫的繁殖力。在大部分昆虫中，保幼激素对卵黄发生起重要的作用，它诱导脂肪体合成卵黄原蛋白，然后释放到血淋巴中，被发育的卵母细胞选择性吸收并“加工”成卵黄蛋白（Vitellin）[3]。关于保幼激素及其类似物对昆虫卵黄发生及繁殖的影响，国内外学者已作了大量工作。Edwards 证实灭幼宝能有效地诱导飞蝗脂肪体合成卵黄原蛋白（Vitellogenin），但用药后的飞蝗不能产卵[4]。而猫蚤 *Ctenocephalides felis* 暴露于灭幼宝后，所产的卵缺少卵黄，卵萎陷，或是没有形成胚盘，从而抑制了猫蚤的繁殖力。灭幼宝在一定程度上干扰了卵黄蛋白的正常沉积及胚盘的形成[5]。Wojchowski 报道，德国小蠊的 Vt 包含 Vg 具有的全部抗原决定簇，Vg 和 Vt 具有相同的免疫原性[6]。因此制备抗 Vt 的抗体也可用来检测 Vg 的含量。本实验研究了德国小蠊脂肪体、血淋巴中 Vg 含量及卵巢中 Vt 含量在第一促性腺周期的动态变化规律；另外对新羽化雌虫点滴处理，观察药物对其繁殖的影响，试图解释灭幼宝对德国小蠊卵黄发生及繁殖影响的机理。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

本实验室传代养殖的德国小蠊。温度（26±1)℃，湿度（55±1)%，光照 12:12（L:D)，喂食小鼠饵料，供水。

1997-08-29 收稿，1999-03-24 收修改稿

1.2 试剂

灭幼宝（Pyriproxyfen）：日本住友公司产品，纯度 98%。购于农业部农药检定所。

1.3 用药处理

雌虫羽化第 2 天用 CO_2 麻醉，冰台上操作。给药组：每只昆虫中胸腹板点滴 1 μL 灭幼宝丙酮溶液（4 μg/μL）；对照组：点滴 1 μL 丙酮。

1.4 样品的制备

CO_2 麻醉昆虫，切断后足基部，血淋巴从切口溢出成小水珠状，定量吸取血淋巴，溶于 0.4 mol/L NaCl 溶液（含 1 mmol/L PMSF）中待测。取其腹部，去掉肠、附腺、卵巢等组织，将该部分和卵巢分别在 PBS 缓冲液中充分漂洗以去除血淋巴中的卵黄原蛋白，然后在 0.4 mol/L NaCl 溶液中充分匀浆，10 000 r/min 离心 20 min，收集上清液，保存于 −20℃。

1.5 酶联免疫（ELISA）测定卵黄原蛋白含量

按于长明[7]方法。

1.6 单向免疫扩散

参照李成文[8]方法，抗血清制备参照文献 [7]，按 1:72 稀释。

1.7 灭幼宝对繁殖影响的观察

将羽化 24 h 的雌虫处理后，与未处理的新羽化雄虫单缸养殖（每缸 1 雌，1 雄），每组设置 15 个重复。观察卵鞘形成及卵鞘孵化的情况。

1.8 数据处理

实验中数据计算用 Microsoft Excel 5.0 处理，结果以 $X \pm SD$ 表示；统计用 SAS 软件；图表制作用 Origin 2.94，组间显著性检验用 Student-t 法。

2 实验结果

2.1 灭幼宝对脂肪体卵黄原蛋白（Vg）含量的影响

总体方差分析处理组和对照组德国小蠊脂肪体 Vg 含量有显著性差异（$P < 0.01$）。结合图 1，灭幼宝处理新羽化雌虫后，脂肪体 Vg 的含量明显高于对照组。处理组在羽化后第 4 天 Vg 的含量急剧上升，第 5 天达到一个高峰，在第 7 天达到最高；而对照组平缓上升，到第 6 天达到峰值，随后呈平缓下降趋势，可见，灭幼宝在雌虫新羽化后点药，大大促进了脂肪体 Vg 合成（图 1）。以时间区组，对照组、处理组在不同时间点 Vg 含量差别均明显（$P < 0.01$）。说明未交配的雌虫在羽化后不同时间 Vg 含量不同。Vg 含量测定按 ELISA 法。

2.2 灭幼宝对血淋巴卵黄原蛋白（Vg）浓度的影响

总体方差分析处理组和对照组德国小蠊血淋巴 Vg 含量有显著性差异（$P < 0.01$）。新羽化雌虫经灭幼宝处理后，第 2 天血淋巴中 Vg 的浓度已明显高于对照组，以后两天平缓上升，

到第 5 天急剧升高，Vg 的浓度为对照组同期的 2.6 倍。处理组 Vg 浓度在第 6 天迅速下降，在第 7 天又达到峰值，在随后的两天迅速下降，总的变化趋势是双峰模式。而对照组血淋巴 Vg 浓度明显低于处理组，在第 6 天达到峰值，然后平缓下降，总的变化趋势与脂肪体中 Vg 含量的变化趋势相符合。可见，灭幼宝处理后，使血淋巴中 Vg 的浓度提高（图 2）。血淋巴 Vg 含量按 ELISA 法测定。

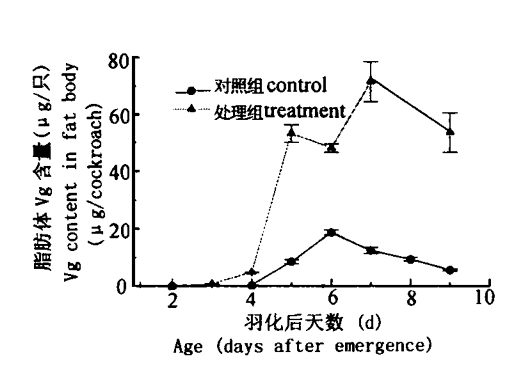


图 1　灭幼宝对脂肪体 Vg 含量的影响

Fig.1　Effect of pyriproxyfen on Vg content in fat body

图 2　灭幼宝对血淋巴 Vg 浓度的影响

Fig.2　Effect of pyriproxyfen on Vg concentration in haemolymph

2.3　灭幼宝对卵巢卵黄蛋白（Vt）含量的影响

灭幼宝处理组 Vt 的含量在第 5、7 天明显高于对照组，而在第 9 天明显下降，仅为对照组的 50%左右；对照组卵巢中 Vt 含量在第 9 天上升到处理组第 7 天水平（图 4）。解剖观察发现处理组昆虫卵母细胞的形态呈周期性变化，一般在第 3 天卵巢开始膨大，卵母细胞已肉眼可见，随后继续膨大，在卵鞘形成前 1～2 天卵母细胞开始萎陷；而对照组的卵母细胞未出现萎陷。卵巢 Vt 含量测定按标准曲线（图 3）。

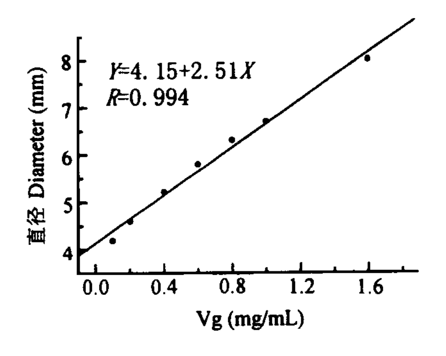


图 3　单向扩散测定卵黄蛋白标准曲线

Fig.3　Standard curve of single direction immuno-diffusion determining vitellin content

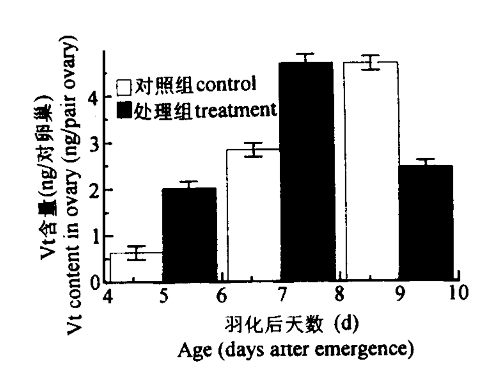


图 4　灭幼宝对卵巢 Vt 含量的影响

Fig.4　Effect of pyriproxyfen on Vg concentration in ovary

2.4 灭幼宝对雌虫繁殖的影响

处理组：平均出荚日期为羽化后第8.5天，且卵鞘干瘪扭曲，1～2天后卵鞘脱落，不能孵化出若虫。对照组：平均出荚日期为羽化后第10天，且卵鞘外形正常，每卵鞘平均孵化若虫数为31只（表1，图5）。可见，灭幼宝抑制了德国小蠊成虫的繁殖能力，对雌虫造成绝育。

表1 灭幼宝对德国小蠊雌虫繁殖的影响

Table 1 Effect of pyriproxyfen on reproduction of *Blattella germanica*

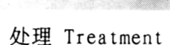
	虫数（头） No. of cockroaches	出荚日期（天） Preoviposition period (Days)	第一卵鞘孵化虫数（头） Nymphs hatched from the first ootheca
对照组 control	15	10.4±0.8	31.2±1.4
处理组 treated	15	8.46±0.6*	0*

注：$\bar{X} \pm SD$，处理组与对照组相比 * $P<0.01$（$P<0.01$ compared with control）

3 讨论

本实验中，灭幼宝明显促进了德国小蠊脂肪体Vg的合成，处理组血淋巴Vg的浓度明显高于对照组且呈双峰模式，卵巢内Vt含量在形成卵鞘前已减少至同期对照组50%水平。灭幼宝处理后，雌虫的繁殖受到明显抑制。经解剖发现，用药后的卵母细胞经历先膨大，然后萎缩的过程。从血淋巴Vg浓度变化趋势和卵母细胞形态变化方面来说，与Edwards[4]的结果相似。推测由于灭幼宝的刺激，使卵黄发生前期Vg合成、释放速度加快，造成脂肪体、血淋巴Vg含量明显增高；由于缺乏灭幼宝的持续刺激，后期卵母细胞对卵黄蛋白的摄取受阻，形成血淋巴Vg浓度的第2个峰。马得拉蜚蠊切除卵巢后导致Vg在血淋巴中积累，最终也积累于脂肪体细胞[9]。由此推测灭幼宝处理后脂肪体Vg的含量在第一促性腺周期结束前仍保持相当高的水平，Vg释放进入血淋巴，最终积累于脂肪体。另一种可能是Vg释放的终止，血淋巴代谢掉Vg，从而使血淋巴中Vg的浓度在形成卵鞘前迅速下降，在脂肪体中保持相当高的水平。







未处理 Untreatment

图5 灭幼宝处理和未处理雌虫卵鞘形态比较

Fig.5 Oothecae deformation in *Blattella germanica* by pyriproxyfen

对照组在喂食相同饲料的情况下，能够形成正常的卵鞘，并孵化出若虫，说明卵母细胞被重吸收并不是由于营养状况的原因，这不同于张建中以七星瓢虫为对象所得的结果[10]。可能是灭幼宝作用于昆虫后，导致体内正常生理状态的破坏，形成不利于卵黄发生、胚胎发生的内环境，虽然也能形成卵鞘，但它不含发育的卵细胞，因此使昆虫的繁殖受到影响，生殖力下降。由此看来，灭幼宝对德国小蠊生殖力抑制的机理与对猫蚤的作用并不相同。

参 考 文 献 （References）

1 Kawada H，Kojima I，Shinjo G. Laboratory evaluation of a new insect growth regulator pyriproxyfen as a cockroach control agent. Jpn. J. Sanit. Zool.，1989，40（3）：195～201

2 Kawada H，Senbo S，Abe Y. Effects of pyriproxyfen on the reproduction of the housefly，*Musca domestica*，and the German cockroach，*Blattella germanica*. Jpn. J. Sanit. Zool.，1992，43（3）：169～175

3 Engelmann F. Insect vitellogenin：identification，biosythesis，and role in vitellogenesis. Adv. Insect. Phsiol.，1979，14：49～108

4 Edwards G C，Braun R P，Wyatt G R. Induction of vitellogenin synthesis in *Locusta migratoria* by the juvenile hormone analog，pyriproxyfen. J. Insect. Physiol.，1992，39（7）：609～614

5 Palma K G，Meola S M，Meola R W. Mode of action of pyriproxyfen and methoprene on eggs of *Ctenocephalides felis*（Siphonaptera：pulicidae）. J. Med. Entomol.，1993，30（2）：421～426

6 Wojchowski D M，Parsons P，Nordin J H *et al*. Processing of pro-vitellingenin in insect fat body：a role for high-mannose oligosaccharide. Dev. Biol.，1986，116：422～430

7 于长明，李成文，刘　泉. ELISA 测定德国小蠊卵黄蛋白含量方法的建立. 寄生虫与医学昆虫学报，1998，5（4）：246～252

8 李成文. 现代免疫化学技术. 上海：上海科学技术出版社. 1992，185

9 Bownes M. Expression of the genes coding for vitellogenin（yolk protein）. Ann. Rev. Entomol.，1986，31：507～531

10 张建中，翟启慧. 七星瓢虫的卵黄发生：保幼激素类似物对卵黄原蛋白合成的调节. 昆虫学报，1985，28（2）：121～127

11 龚　和，翟启慧. 昆虫卵黄原蛋白和卵黄发生. 昆虫学报，1979，22（2）：219～236

EFFECTS OF PYRIPROXYFEN ON VITELLOGENESIS AND REPRODUCTION OF THE GERMAN COCKROACH，*BLATTELLA GERMANICA*

Yu Changming　　Liu Quan　　Li Chengwen

（Institute of Microbiology & Epidemiology，Beijing　100071）

Abstract　As a juvenile hormone analog（JHA），pyriproxyfen has showed a very high efficacy in cockroach control. The effects of JHAs on vitellogenesis and reproduction in many insects have been widely reported. In this study，the effect of pyriproxyfen on the vitellogenesis and reproduction of *Blattella germanica* has been investigated by employing immunological and biochemical methods. When the female adults were treated with pyriproxyfen，the synthesis of vitellogenin in fat body was promoted，and the biomodel of vitellogenin in haemolymph exhibited a very different pattern，i. e. 2 peaks of vitellogenin content. Vt began to accumulate earlier and maintained at a very high level for several days，then decreased quickly afterward in the ovary of treated female. At the 9th day the Vt content lowered to half of the peak level in the normal adult of the same day-age. When the newly emerged female adults were treated with this JHA，they became sterilized.

Key words　pyriproxyfen，vitellogenin，vitellin，*Blattella germanica*，reproduction